

SM22 启动 SCAP 真核表达质粒的构建及其在 CHO 细胞中的表达

王媛媛¹, 胡接力¹, 崔静¹, 黄爱龙¹, 阮雄中^{1,2}, 陈压西¹

1 重庆医科大学附属第二医院 教育部感染性疾病分子生物学重点实验室 脂质研究中心, 重庆 400016

2 Center for Nephrology, Royal Free and University College Medical School, University College London, Royal Free Campus, London, UK

摘要: 为建立平滑肌特异的固醇调节元件结合蛋白 (SREBP) 的裂解激活蛋白 (SCAP) 超表达的转基因小鼠, 深入探讨 SCAP 的功能, 本实验构建了由平滑肌特异蛋白 SM22 启动子 (pSM22) 启动仓鼠 SCAP 443 位点突变体—SCAP (D443N) 的真核表达质粒, 并在仓鼠卵巢细胞 (CHO) 验证其表达。利用巢式 PCR 从小鼠肝脏组织提取的基因组中扩增得到 pSM22 基因。先将其插入 pMD-T 载体, 构建 T-SM22, 对 pSM22 测序后, 通过双酶切将 pSM22 克隆到 pGL3-control-Luc 中, 成为 pGL3-SM22-Luc。转染 pGL3-SM22-Luc 到血管平滑肌 (VSMCs) 中, 通过检测荧光素酶 (Luc) 值观察 pSM22 在 VSMCs 内的启动活性。利用 PCR 从 pTK-HSV-SCAP (D443N) 质粒中扩增出 SCAP (D443N) 后克隆入 pGL3-control 中, 成为 pGL3-SCAP。然后再将 pSM22 克隆入 pGL3-SCAP 中, 成为表达质粒 pGL3-SM22-SCAP (D443N)。转染表达质粒到 CHO 细胞, 用 real-time PCR 和 Western blotting 验证 SCAP (D443N) 的表达。结果证实 pSM22 在体外 VSMCs 中能启动 Luc 的表达; 表达质粒 pGL3-SM22-SCAP (D443N) 酶切及测序结果正确; 将其转染到 CHO 细胞后, 与转染 pGL3-control 的对照细胞相比 SCAP (D443) mRNA 和蛋白表达显著增强。

关键词: SM22, 启动子, SREBP 裂解激活蛋白, 质粒构建, 基因表达, 转染

Construction of pGL3-SM22-SCAP (D443N) eukaryotic expression vector and its expression in CHO cells

Yuanyuan Wang¹, Jieli Hu¹, Jing Cui¹, Ailong Huang¹, Xiongzong Ruan^{1,2}, and Yaxi Chen¹

1 Center for Lipid Research, Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2 Center for Nephrology, Royal Free and University College Medical School, University College London, Royal Free Campus, London, UK

Abstract: The experiment was designed to investigate the function of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) mutant (D443N) by constructing an eukaryotic expressive vector using a smooth muscle specific promoter SM22 (pGL3-SM22-SCAP(D443N)). SM22 promoter (pSM22) was amplified from genome DNA of mice by nested PCR, and then cloned into pMD-T vector. The SM22 promoter fragment released from the vector by *Kpn* I and *Hind* III digestion was sub-cloned into pGL3-control-Luc vector, to form

Received: July 25, 2009; **Accepted:** September 29, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30772295, 30871159, 30971389, 30530360), Natural Science Foundation of Chongqing (No. 2008BA5016).

Corresponding author: Yaxi Chen and Xiongzong Ruan. Tel: +86-23-68486780; Fax: +86-23-68486780; E-mail: zlcxyi@sina.com
国家自然科学基金 (Nos. 30772295, 30871159, 30971389, 30530360), 重庆市自然科学基金 (No. 2008BA5016) 资助。

pGL3-SM22-Luc. The activity of pSM22 in human vascular smooth muscle cells (VSMCs) was tested using Dual-Luciferase Reporter System. SCAP(D443) mutant amplified from plasmid pTK-HSV-SCAP(D443N) and pSM22 from mice liver were cloned into pGL3-control vector to construct pGL3-SM22-SCAP(D443N) which was transfected into Chinese hamster ovary cells (CHO) to test SCAP(D443) expression by real-time PCR and Western blot. The sequence and construction of pGL3-SM22-SCAP(D443N) were correct. SM22 promoter activity initiated the expression of luciferase in VSMCs and also drove SCAP(D443) expression in transfected CHO cells. The pGL3-SM22-SCAP(D443N) eukaryotic expression vector was successfully constructed and the recombinant vector provides a powerful approach in investigating the function and regulation of SCAP and also in producing vascular smooth muscle specific SCAP transgenic mice.

Keywords: SM22, promoter, SREBP cleavage-activating protein, plasmid construction, gene expression, transfection

固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白 (SCAP) 是存在于内质网的细胞内胆固醇敏感器,也是固醇调节元件结合蛋白 (SREBP) 的锚定蛋白,在调节细胞内胆固醇水平中起着非常关键的作用^[1]。当细胞内胆固醇缺乏时,它可以将 SREBP 从内质网运送至高尔基体发生裂解,裂解的活性片段进入细胞核,引起在启动子区域含有胆固醇调节元件 (SRE) 的下游靶基因转录激活,从而导致细胞对胆固醇的合成和摄取增加。相反,在细胞内胆固醇过负荷时,SCAP 与内质网上的固定蛋白胰岛素诱导基因 (Insig-1,2) 结合,将 SREBP 锚定在内质网而不向高尔基体转运,从而停止对下游靶基因 (如 LDL 受体和 HMG CoA 还原酶) 的转录激活。本研究室大量的前期研究表明,当肝细胞内过度表达 SCAP,可以导致肝细胞内脂质摄取与合成增加及脂肪肝发生^[2];当血管平滑肌细胞 SCAP 过度表达时,亦会导致胆固醇异常积聚,形成泡沫细胞^[3]。虽然野生型 SCAP 过表达时会引起胆固醇对 LDL 受体负反馈调节失调,但当 SCAP 基因位于胆固醇敏感区的第 443 个密码子存在点突变时,SCAP 将不再受细胞内胆固醇水平的反馈调节,这样会彻底打破细胞内胆固醇对靶基因的负反馈调节^[4]。同时,平滑肌特异蛋白 SM22 启动子在体外能够广泛表达,而在体内却具有在动脉平滑肌上的表达特异性^[5]。因此,本实验选定 SCAP (D443N) 突变体与 SM22 启动子 (pSM22),首次构建了 pGL3-SM22-SCAP (D443N) 真核表达质粒,为今后建立血管平滑肌特异的 SCAP 超表达转基因小鼠、深入探讨 SCAP 的功能及动脉粥样硬化发生的新机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) (重庆医科大学教育部感染性疾病分子生物学重点实验室);血管平滑肌细胞株 (VSMCs) (英国 Buckinghamshire, TCS cell works); DMEM-F12 培养基、优等胎牛血清 (赛默飞世尔化学制品有限公司);载体 pMD18-T、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及限制性内切酶 *Bgl* II、*Xba* I、*Bam* H I、*Kpn* I、*Hind* III、*Sal* I (大连宝生物工程技术有限公司);蛋白提取试剂盒 (凯基生物科技发展有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒 (北京鼎国生物技术有限公司);转染试剂 Lipofectamine™-2000 (美国 Invitrogen 公司);质粒提取试剂盒,质粒载体 pGL3-control、pGL3-enhancer、pEGFP-N1,双荧光素酶报告基因检测系统 (美国 Promega 公司);质粒 pTK-HSV-SCAP-T7(D443N) 及兔源抗 SCAP 多克隆抗体 (英国 UCL 大学皇家自由医学院肾脏病研究中心惠赠);DNA 提取试剂盒 (德国 QIAGEN 公司);兔源抗 β -actin 多克隆抗体、羊抗兔 HRP 标记二抗 (美国 santa cluz 公司);引物合成 (上海生工生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

CHO 细胞株在含 10% 优等胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 DMEM-F12 培养基中,VSMCs 细胞在 20% 优等胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 DMEM-F12 培养基中,均于 20% O₂、5% CO₂、75% N₂ 的常氧孵箱中 37°C 培养。

1.2.2 pGL3-SM22-Luc 质粒的构建

参考 Moessler 等^[5]的研究结果,设计两对引物 F1、R1 和 F2、R2 (表 1) 做巢式 PCR 扩增 pSM22。先用外引物 F1、R1 对小鼠肝脏的基因组 DNA 进行扩增,再利用内引物 F2、R2 对上述 PCR 产物重新扩增获得全长为 2188 bp 的 pSM22 序列。然后将 pSM22 的 PCR 产物插入 pMD18-T 载体,成为 T-SM22。由于 pSM22 可以正反两种方向插入 pMD18-T,对 T-SM22 进行酶切鉴定,挑选出酶切位点 *Kpn* I 位于 pSM22 上游、*Hind* III 位于其下游的质粒进行酶切,然后将切出的 pSM22 片段克隆入 pGL3-control-Luc 中,成为 pGL3-SM22-Luc。

表 1 PCR 扩增引物序列设计

Table 1 Primers used in the study

Primers	Sequence (5'-3')
F1	GGCCCCAGGAATGTGTTTC CTTCTC
R1	TCTGCTCCCATGACTTGCCTTACA
F2	TCCACCATGTTTTATAGCTCTTGG
R2	AAGGCTTGGTCGTTTGTGGACTGGA
F3	GATAGATCTATGACCCTGACTGAAAGGCTGCGT
R3	CATTCTAGATCAGTCCAGTTTCTCCAGCAC
F4	TGCCCTGAGGCTCTTTTCC
R4	TCGTGGATGCCACAGGATT
F5	CTGGCAGTAGATGTGTTCCGATT
R5	CAGTACGTGATCCGGATTTC

1.2.3 pGL3-SM22-SCAP(D443N) 质粒的构建

pGL3-SCAP 质粒的构建 (图 1): 根据 GenBank (Accession No. U67060) 中的 SCAP 序列信息设计一对引物 F3、R3 (表 1), 从质粒 pTK-HSV-SCAP-T7(D443N) 中扩增出 SCAP 片段, 使 SCAP 上游含有 *Bgl* II 酶切位点和 ATG 翻译起始密码子, 下游含有 *Xba* I 酶切位点。用 *Bgl* II 和 *Xba* I 酶切 pGL3-control 质粒和 SCAP 的 PCR 产物, 将线性带有粘性末端的全长 SCAP cDNA 和 pGL3 载体大片段置于 16°C 过夜连接, 转化入大肠杆菌 DH5 α , 少量提取获得的质粒 pGL3-SCAP。

pGL3-SM22-SCAP(443N) 质粒构建 (图 1): 用 *Bam* H I 和 *Sal* I 酶切 T-SM22, 使 pSM22 上游含有 *Bam* H I 的酶切位点, 下游含有 *Sal* I 的酶切位点,

然后将 pSM22 克隆入 pEGFP-N1, 再用 *Bam* H I 和 *Bgl* II 将其酶切克隆到用 *Bam* H I 处理的 pGL3-SCAP 质粒中 (*Bam* H I 和 *Bgl* II 为同尾酶)。由于 pSM22 能以正反两种方向与 pGL3-SCAP 进行连接, 利用酶切筛选出 pSM22 和 SCAP 方向一致的正确克隆后, 获得 pGL3-SM22-SCAP(D443N)。

1.2.4 DNA 测序

DNA 测序由本实验室完成, 采用 ABI PRISM 3100 genetic Analyzer 全自动测序仪, 双脱氧链末端终止法, 对 T-SM22 和 pGL3-SM22-SCAP(D443N) 中的 pSM22 及 SCAP 序列进行测序。同一片段经正反两个方向分别进行测序反应。

1.2.5 pSM22 在 VSMCs 细胞中的启动活性测定

VSMCs 转染: 按照转染试剂说明于转染前 1 天接种细胞入 24 孔板, 24 h 后至细胞长至 90% 汇合时, 每孔分别定量加入 pGL3-SM22-Luc 或 pGL3-control-Luc (阳性对照) 或 pGL3-enhancer (阴性对照) 0.8 μ g 和 pRL-TK 内参照质粒 0.1 μ g, 按照 DNA (μ g): 脂质体 (μ L) 为 1:4 的比例转染 VSMCs, 4 h 后换液, 继续培养 24 h。

报告基因活性检测: 转染 24 h 后按照双荧光素酶 (Luc) 报告基因检测系统试剂说明裂解细胞, 检测 Luc 活性。分别计算 Firefly Luc/Rellina Luc 的比值, 以 pGL3-control-Luc 和 pGL3-enhance 转染细胞作为对照, 比较判断 pSM22 的启动活性。

1.2.6 pGL3-SM22-SCAP(D443N) 真核表达质粒的表达

CHO 细胞的转染: 按照转染试剂说明, 转染前一天接种合适密度的细胞至 10 cm 细胞培养皿, 24 h 后待细胞长至 90% 汇合时, 按照 DNA (μ g): 脂质体 (μ L) 为 1:1.3 的比例分别转染 pGL3-SM22-SCAP (D443N)、pGL3-control 和 pGL3-SCAP 至 CHO 细胞, 于 4 h 后换液, 36~48 h 后提取细胞总 mRNA 和胞浆蛋白。

Real-time PCR 检测 SCAP 基因的转录: 将 CHO 细胞的总 RNA 逆转录为 cDNA, 设计两对引物, 仓鼠 β -actin 引物 F4、R4 和仓鼠 SCAP 引物 F5、R5 (表 1) 进行 real-time PCR, 根据结果进行相对

定量分析。

Western blotting 检测 SCAP 蛋白的表达: 收集细胞提取胞浆蛋白后, 50 μg /孔上样量进行 5% 和 8% SDS-PAGE 电泳, 分离 SCAP 和 β -actin, 转膜后以 5% 的脱脂奶粉于 TBST 中室温封闭 1 h,

然后用相应的一抗和二抗进行杂交, 最后用 ECL 显色。

1.3 统计学分析

试验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 统计学分析采用组间比较的 t 检验。

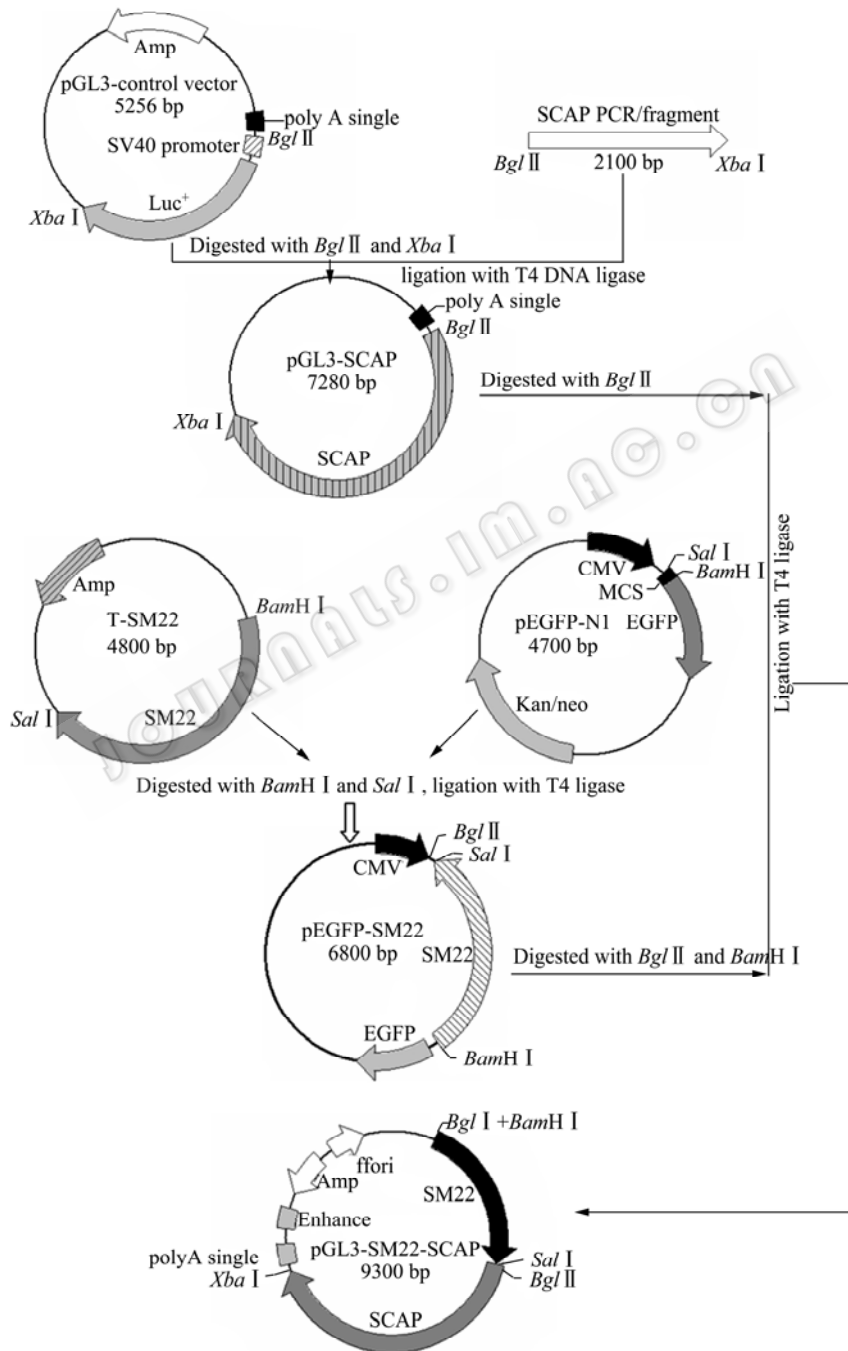


图 1 pGL3-SM22-SCAP(D443N) 质粒的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pGL3-SM22-SCAP (D443N).

2 结果

2.1 重组真核表达质粒 pGL3-SM22-SCAP (D443N) 的构建与鉴定

由于巢式 PCR 获得的 pSM22 PCR 产物可以以正反两种方向插入到 pMD18-T 中, 所以需用酶切的方法挑选出所需方向的克隆, 即 *Bam*H I 和 *Kpn* I 位点位于 pSM22 上游的 T-SM22 质粒。如果插入方向与预期相符, 用 *Spe* I 和 *Hind* III 双酶切克隆质粒即得到约 4.4 kb 和 460 bp 的两条片段 (图 2)。由于 *Bam*H I 和 *Bgl* II 是同尾酶, 当 pSM22 以这两个酶从 pEGFP-SM22 中切出, 插入由 *Bgl* II 单酶切的 pGL3-SCAP 质粒时, 也会出现正反方向两种插入形式。用酶切的方法挑选出所需方向的克隆, 即选出 *Bgl* II 和 *Bam*H I 的粘末端连接位于 pSM22 的上游, *Bgl* II 和 *Bgl* II 粘末端的连接位于下游的克隆为目的质粒, 如果插入方向与预期相符, 用 *Bam*H I 和 *Bgl* II 双酶切就可得到 4.3 kb 和 5.0 kb 两条酶切片段 (图 3)。

2.2 pSM22 及 SCAP 基因的测序

对质粒 T-SM22 和 pGL3-SM22-SCAP 中的 pSM22 及 SCAP 序列进行全长测序, 结果表明 pSM22 与文献报道^[5]的序列同源性达 99%, SCAP 与购买于 ATCC 的质粒 pTK-HSV-SCAP-T7(D443N) 中的 SCAP 序列一致并存在 SCAP 第 1327 个碱基 G→A 的突变, 即第 443 个密码子天冬氨酸 (D)→天冬酰胺 (N) 的突变 (图 4)。

2.3 pSM22 启动子在 VSMCs 细胞中的活性测定

Luc 测定结果显示, SM22 在 VSMCs 中具有启动子活性。pGL3-enhancer 阴性对照的测定值为 0.23, pGL3-control-Luc 的阳性对照值为 0.88 ($P < 0.05$ vs pGL3-enhancer), pGL3-SM22-Luc 的测定值为 1.21 ($P < 0.05$ vs pGL3-enhancer) (图 5)。

2.4 Real-time PCR 检测细胞内 SCAP mRNA 的表达

设计内参 β -actin 引物 F4、R4 和 SCAP 引物 F5、R5 (表 1) 进行 real-time PCR。结果显示, 转染 SCAP (D443N) 的 T 组与转染 pGL3-control 的 C1 组和转染 pGL3-SCAP 的 C2 组比较, SCAP mRNA 表达均有明显的提高。T 组与 C1 组比较 SCAP mRNA 有 22 倍的升高 ($P < 0.05$), 两者有显著性差异 (图 6)。

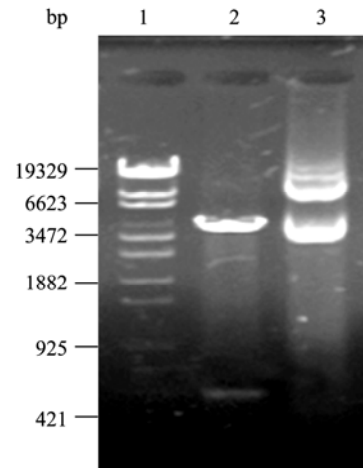


图 2 T-SM22 的双酶切鉴定

Fig. 2 Characterization of T-SM22 by enzyme digestion. 1: DNA marker; 2: T-SM22 digested with *Hind* III and *Spe* I; 3: T-M22 plasmid.

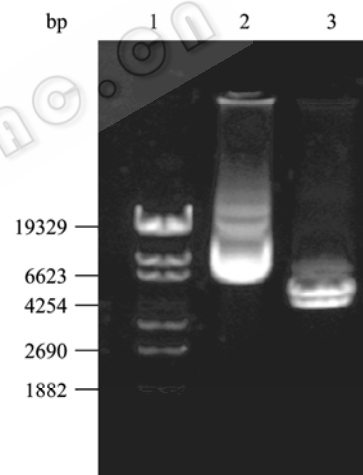


图 3 pGL3-SM22-SCAP 的双酶切鉴定

Fig. 3 Characterization of pGL3-SM22-SCAP by enzyme digestion. 1: DNA marker; 2: pGL3-SM22-SCAP plasmid; 3: pGL3-SM22-SCAP digested with *Bam*H I and *Bgl* II.

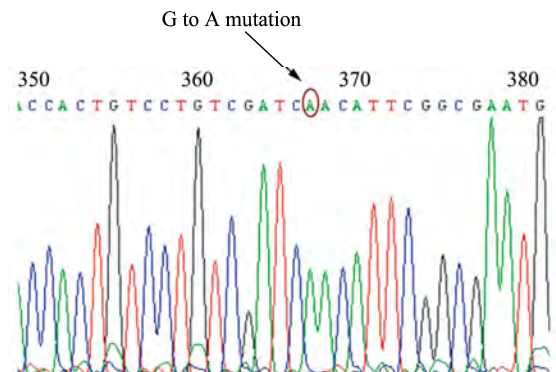


图 4 SCAP 基因测序

Fig. 4 Sequencing of SCAP.

2.5 pGL3-SM22-SCAP 在细胞内的蛋白表达

利用 Western blotting 技术,以 β -actin 作为内参,检测分别转染了 pGL3-control、pGL3-SCAP 及 pGL3-SM22-SCAP(D443N) 的 CHO 细胞的 SCAP 蛋白表达。正常条件下,CHO 细胞中有少量正常 SCAP 的蛋白表达,但在转染了 pGL3-SM22-SCAP (D443N) 后,SCAP 蛋白超表达,表达量明显高于对照组 (图 7)。

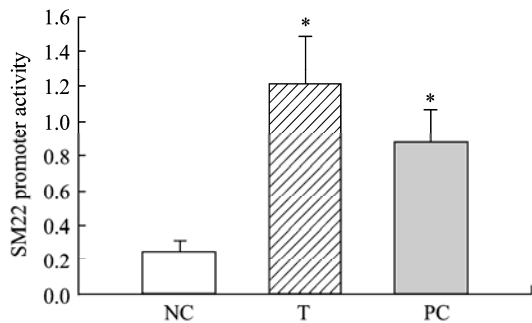


图 5 双荧光素酶报告基因检测 pSM22 启动子活性

Fig. 5 Promoter activity of pSM22 detected by dual-luciferase reporter gene assay. NC: transfected with pGL3-enhancer; T: transfected with pGL3-SM22-Luc; PC: transfected with pGL3-control-Luc. * $P < 0.05$ compared with NC group.

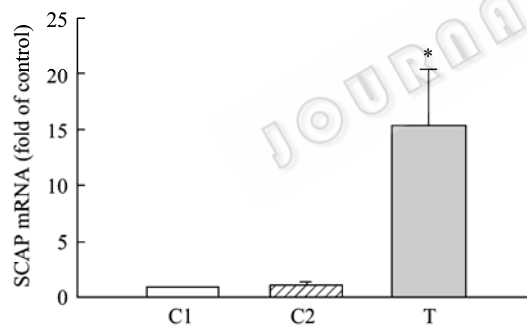


图 6 SCAP mRNA 的 real-time PCR 结果

Fig. 6 SCAP mRNA level examined by real-time PCR. C1: CHO cells transfected with pGL3-control; C2: CHO cells transfected with pGL3-SCAP; T: CHO cells transfected with pGL3-SM22-SCAP (D443N). * $P < 0.05$ compared with C1 group.

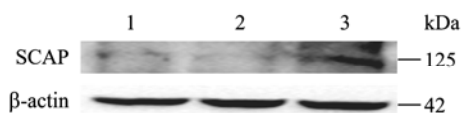


图 7 Western blotting 检测 pGL3-SM22-SCAP 在 CHO 细胞中的蛋白表达

Fig. 7 Expression of SCAP protein in CHO cells (Western blotting). 1: CHO cells transfected with pGL3-control; 2: CHO cells transfected with pGL3-SCAP; 3: CHO cells transfected with pGL3-SM22-SCAP (D443N).

3 讨论

正常生理条件下,由于 SCAP 能敏感地感受到细胞内脂质的变化,从而有效地控制细胞胆固醇的合成和摄取,防止泡沫细胞的形成。然而,在受外界因素如炎症的刺激下,SCAP 和 SREBP 的表达异常增加,以致没有足够的内质网滞留分子,如 Insig-1 来锁住 SCAP,导致即使在高细胞内胆固醇浓度的情况下,仍然运载 SREBP 到高尔基体内裂解激活,并激活其下游靶基因 LDL 受体和 HMG CoA 还原酶的表达,导致细胞(如 VSMCs,肾脏系膜细胞)无控制地摄取和合成 LDL 胆固醇,形成泡沫细胞^[3,6]。当第 443 个密码子存在点突变的 SCAP 即 SCAP (D443N) 存在于细胞内时,细胞将完全打破胞外胆固醇的负反馈调节,SCAP (D443N) 不受限制地运载 SREBP2 至细胞核^[4]。因此选择将 SCAP (D443N) 过表达于细胞内将更有利于泡沫细胞的生成。

平滑肌特异蛋白 SM22 是一种在平滑肌中含量丰富的蛋白。将 SM22 进行克隆后发现,它可以显著地表达于体外的不同系统,而与这种泛宿主性表达不同的是,SM22 在体内同其他平滑肌标志蛋白一样严格特异地表达于平滑肌细胞,而本实验所构建质粒中的 pSM22 启动子包含了从 SM22 的转录起始位点至其上游-446 bp 的序列,这一区域介导了它在体内动脉平滑肌上的特异性表达^[5]。

本实验证实 pSM22 在 VSMCs 中具有启动子活性。由于 VSMCs 为原代培养细胞,转染效率有限,且细胞本身 SCAP 含量丰富,不利于质粒的表达鉴定。而 CHO 细胞作为脂代谢相关基因的低背景细胞广泛运用于脂代谢的研究^[7-8],鉴于 pSM22 在体外细胞的泛宿主性及 SCAP (D443N) 来源于突变的 CHO 细胞系,本实验构建了由 pSM22 启动 SCAP (D443N) 的真核表达质粒瞬时转染于野生型的 CHO 细胞,进行表达鉴定。结果发现转染后的 CHO 细胞内 SCAP mRNA 及蛋白的表达量都远远高于未转染组,证实构建的真核表达质粒能够正常表达于体外细胞。结合质粒酶切鉴定及测序结果表明质粒构建成功。

由于 SCAP (D443N) 的特殊生物学功能,pGL3-SM22-SCAP(D443N) 质粒的成功构建对于进

一步在体内研究 SCAP 的各种调节功能及其在动脉硬化发生的作用具有重要意义；同时也为下一步采用原核微注射技术^[9-10]得到动脉平滑肌 SCAP (D443N) 特异表达的转基因小鼠提供了材料。

REFERENCES

- [1] Adams CM, Brown MS, Goldstein JL, *et al.* Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and insigs. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 52772–52780.
- [2] Ma KL, Ruan XZ, Powis SH, *et al.* Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice. *Hepatology*, 2008, **48**(3): 770–781.
- [3] Ruan XZ, Moorhead JF, Tao JL, *et al.* Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**(5): 1150–1155.
- [4] Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS, *et al.* Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell*, 1996, **87**: 415–426.
- [5] Moessler H, Mericskay M, Li Z, *et al.* The SM22 promoter directs tissue-specific expression in arterial but not in venous or visceral smooth muscle cells in transgenic mice. *Development*, 1996, **122**: 2415–2425.
- [6] Ruan XZ, Varghese Z, Powis SH, *et al.* Dysregulation of LDL receptor under the influence of inflammatory cytokines: a new pathway for foam cell formation. *Kidney Int*, 2002, **60**: 1716–1725.
- [7] Russell A, DeBose-Boyd, Brown MS, *et al.* Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell*, 1999, **99**: 703–712.
- [8] Gong Y, Lee JN, Lee P, *et al.* Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metabolism*, 2006, **3**: 15–24.
- [9] Simons JP, McClenaghan M, Clark AJ. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. *Nature*, 1987, **328**: 530–532.
- [10] al-Shawi R, Kinnaird J, Burke J, *et al.* Expression of a foreign gene in a line of transgenic mice is modulated by a chromosomal position effect. *Mol Cell Biol*, 1990, **10**(3): 1192–1198.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

生物能源技术与工程化

(应用生物技术大系)

张百良 著

978-7-03-025769-7 ¥98.00 2009年12月出版

内容简介

本书是一本研究生物能源技术与工程化的专著,内容包括生物能源技术及生物能源资源现状与评价;高效厌氧生物反应器、生物燃气燃烧设备研制及应用;生物甲醇、生物乙醇、生物柴油生产工艺及技术;生物质成型燃料技术与设备研发、工程化及评价。本书集中体现了生物能源技术和设备的研究思路、技术路线、研究方法、试验过程及应用效果,具有突出的创新性和实践性。

本书适用于生物能源、环境工程、生物化工、农业工程等领域的科研及工程技术人员,也可作为高等院校相关专业研究生的参考用书。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 李韶文 (010-64000849) 周文字 (010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目